仓鼠体内注射不同剂量BrdU的细胞遗传学效应

——应用活性炭吸附BrdU一次注射SCD法

单祥年　盛晓阳　严明　王世浚

（南京铁道医学院生物教研室）

5-溴脱氧脲嘧啶核苷（5—bromo-2'-deoxyuridine, BrdU）能够代替胸腺嘧啶核苷（thymidine）掺入DNA，使姐妹染色单体分色，计算姐妹染色单体互换（sister chromatid exchange, SCE）率，可以估计DNA的损伤。因而，近年来已广泛地应用SCE测定各种诱变因子的活力。但是研究BrdU本身诱变活力的报道不多，且多是离体的研究，体内实验很少。目前国内尚无类似的报道。

本文以我国特产仓鼠为实验材料，采取一次性腹腔注射BrdU活性炭悬浮液方法，研究不同剂量BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞SCE频率、染色体畸变率、分裂指数、细胞增殖周期以及对姐妹染色单体分色的影响。

材料和方法

（一）实验动物　中国黑线短尾仓鼠（*Cricetulus barabensis*）体重为20—25克成年鼠。

（二）BrdU活性炭悬浮液的制备　称取药用活性炭10克，研磨3—4小时，然后加入200毫升蒸馏水悬浮5分钟，收集上半部悬浮液；再经1500转/分钟，离心15分钟，弃去上清液；然后将所得的活性炭用2.5%NaOH、蒸馏水和2.5%HCl分别洗5次；再用蒸馏水洗10次以上，洗涤液达到中性为止。将洗涤后的活性炭置180°C烤箱中乾热消毒30分钟。将用0.9%生理盐水配制的每毫升含20mg的BrdU溶液，按每毫升120mg活性炭粉末制成悬浮液，用黑纸包好置4°C冰箱贮藏备用。根据我们的经验，在冰箱中保存一月，BrdU活性炭悬浮液其效价无明显降低。注射前在37°C水浴中摇动10分钟，即可注入仓鼠体内。

本文1982年12月27日收到，1983年10月4日收到修改稿。

（三）骨髓染色体的制备　将所需剂量的BrdU活性炭悬浮液一次性注入仓鼠腹腔。我们最多注入2毫升BrdU活性炭悬浮液，未见仓鼠有明显的异常反应。注入后24小时按4 μg/g（体重）的剂量腹注秋水仙素，3小时后杀死动物，按常规取出股骨和胸骨的骨髓制备染色体标本。脾脏的淋巴细胞染色体标本制备方法是：取出脾脏后，剪破包膜挤出脾脏细胞团块，剪碎后经过30分钟低渗然后再固定（3次）、滴片。

（四）分色　基本上按照贺维顺等1980年报道的紫外线照射加Giemsa染色的方法，唯片龄我们觉得在2天内分色效果较好。其次是将2×SSC缓冲液pH调至7.5左右，分色效果较好。观察染色体畸变的玻片，不需分色，染色体标本制备后室温放置三天后直接染色观察。不足三天的片子染色，往往出现类似G带的模糊带，易造成畸变观察的差误。

结　果

（一）SCE频率的变化

表1　不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞SCE频率的影响

组　别	BrdU剂量 mg/g（体重）	动物数	观察细胞总数	SCE/细胞 M±S.E
Ⅰ	0.225	3	3×30	2.63±0.36
Ⅱ	0.450	3	3×30	3.26±0.69
Ⅲ	0.675	3	3×30	3.43±0.49
Ⅳ	0.900	3	3×30	5.27±0.47
Ⅴ	1.800	3	3×30	6.29±1.23
Ⅵ	3.600	3	3×30	7.51±0.82

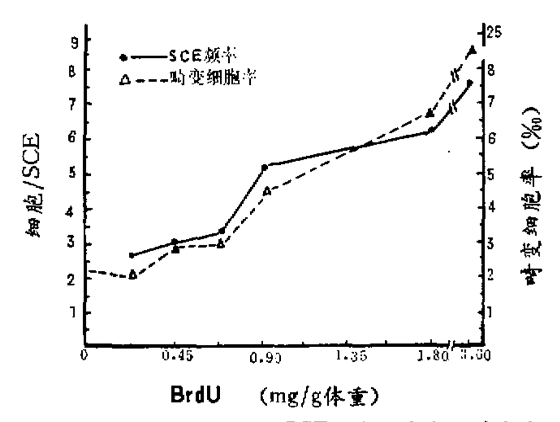


图2　BrdU剂量和仓鼠骨髓淋巴细胞SCE频率和染色体畸变率之间的关系

从表1和图2可以看出，SCE频率随BrdU的剂量增加而增加，如第Ⅰ组SCE平均值为每个细胞2.63，而第Ⅵ组为7.51，后者相当于前者的2.8倍。经统计学处理，第Ⅰ组和Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组的SCE频率之间有高度显著性差异(P<0.01)。第Ⅱ组和Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组的SCE频率之间也均有显著性和高度显著性差异（P值依次为，P<0.05，0.01<P<0.05，P<0.01)。而第Ⅰ和Ⅱ、Ⅲ两组以及Ⅱ组和Ⅲ组之间均无显著性差异（P>0.05）。统计结果说明了SCE值在BrdU为0.225—0.675mg/g（体重）这个剂量范围内是相当接近的，而超过这个范围到0.9mg/g（体重）以上，SCE率就显著上升，因此可以认为Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组的SCE值接近于仓鼠自发SCE频率。即正常仓鼠的SCE频率应该是每个细胞3次左右（图1、4）。

（二）BrdU剂量效应对细胞分裂周期的影响

表2　不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞的细胞周期的影响

组别	BrdU剂量 mg/g(体重)	动物数	观察细胞总数	各细胞周期的平均百分数（%） M_1 M±S.D	M_2 M±S.D	M_3 M±S.D
Ⅰ	0.225	3	3×100	2.67±0.58	38.67±4.62	58.67±4.04
Ⅱ	0.450	3	3×100	5.33±2.52	40.33±4.93	54.33±3.51
Ⅲ	0.675	3	3×100	5.67±1.15	36.50±4.27	57.83±4.64
Ⅳ	0.900	3	3×100	7.67±0.58	36.67±2.52	55.67±1.52
Ⅴ	1.800	3	3×100	9.33±2.52	37.33±6.51	53.33±3.78
Ⅵ	3.600	3	3×100	14.33±2.52	49.67±2.52	36.33±4.51

从表2可以看出，不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞的增殖周期有明显的影响，随着BrdU剂量的递增，M_1期的细胞逐渐增加，统计结果表明：不同剂量BrdU对M_1期细胞的影响有高度显著性差异（P<0.01）。说明BrdU延缓了细胞分裂周期。

（三）BrdU剂量效应对骨髓淋巴细胞染色体畸变率和分裂指数的影响

表3　不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞染色体畸变率和分裂指数的影响

组别	BrdU剂量 mg/g（体重）	动物数	观察细胞总数	断裂和裂隙 单体型	断裂和裂隙 等染色单体型	断片	畸变细胞数	畸变率（%）	分裂指数（‰）1000个细胞/只
对照	0	3	3×100	7	0	0	7	2.33	91.67
Ⅰ	0.225	3	3×100	5	1	0	6	2.00	85.00
Ⅱ	0.450	3	3×100	7	3	0	10	3.33	72.33
Ⅲ	0.675	3	3×100	8	3	0	10	3.33	79.00
Ⅳ	0.900	3	3×100	9	4	0	13	4.33	66.83
Ⅴ	1.800	3	3×100	14	7	0	20	6.67	57.67
Ⅵ	3.600	3	3×100	43	46	1	73	24.33	25.33

表3列出了不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞染色体畸变率和分裂指数的影响，随着BrdU剂量的增加，染色单体和等染色单体断裂（breaks）和裂隙（gaps）和对照组相比有明显的增加，而分裂指数则相应的减少；畸变的增加幅度仍以0.9mg/g（体重）以上更为明显（图2），和SCE频率变化相似。以上结果说明了BrdU既能引起SCE频率的增加又能导致染色体畸变率的增高同时也抑制了细胞分裂。

（四）不同剂量的BrdU对姐妹染色单体分色（sister chromatid differentiation, SCD）的影响

表4　不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓淋巴细胞姐妹染色单体分色的影响

组　别	BrdU剂量 (mg/g体重)	动物数	观察细胞总数	分色良好 (%)	分色差（%）	未分色（%）
Ⅰ	0.225	3	3×100	35.00	62.00	3.00
Ⅱ	0.450	3	3×100	36.36	50.73	12.86
Ⅲ	0.675	3	3×100	67.92	27.55	4.49
Ⅳ	0.900	3	3×100	81.80	11.00	7.20
Ⅴ	1.800	3	3×100	83.00	7.33	9.66
Ⅵ	3.600	3	3×100	83.33	4.00	12.67

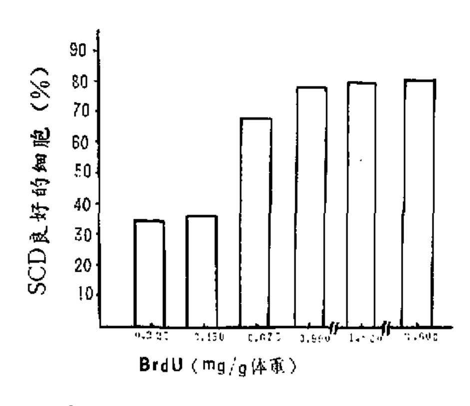


图3　BrdU剂量和姐妹染色单体分色良好的细胞之间的图解

表4和图3证明不同剂量的BrdU在同样的分色条件下SCD的变化，对每个剂量组染色体玻片必须连续数100个分裂相，其等级标准为：姐妹染色单体分色清晰，能准确计算互换率的为分色良好；姐妹染色单体已能看出深浅不同，但计算互换率有困难的为分色差；两个染色单体看不出深浅差异的为未分色。从图表上可看出，随着BrdU剂量的增加，分色良好的细胞数也增加，分色差的细胞则减少，说明BrdU的剂量和SCD有密切关系。0.9mg/g以后的三组，尽管BrdU剂量成倍的增加，但分色良好的细胞组间差异并不大，说明在这几个剂量组中，有足够的未被降解的BrdU取代DNA中的胸腺嘧啶核

片，使姐妹染色单体分色。也就是说在仓鼠体重为20—25克范围内，0.90mg/g的BrdU就足以使绝大多数M_2期以上的细胞分色清晰。

表 5　　不同pH值对仓鼠骨髓淋巴细胞姐妹染色单体分色的影响

缓冲液	pH	观察细胞数	分色良好（%）	分色差（%）	未分色（%）
2×SSC	5	100	17	66	17
2×SSC	6	100	4	66	31
2×SSC	6.8	100	78	17	5
2×SSC	7.5	100	91.5	2.5	6
2×SSC	8	100	88	8	4
2×SSC	9	100	54	37	9
P.B.S.	7.5	100	24	72	4
Dubecoll's液	7.5	100	52	43	5

注：BrdU剂量：0.675mg/g（体重）

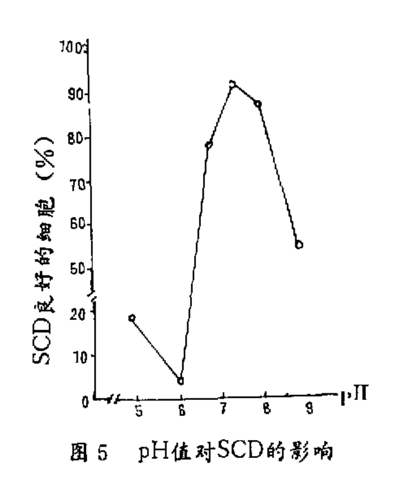


图 5　pH值对SCD的影响

（五）缓冲液pH值对SCD的影响　表 5 是应用同一只仓鼠的骨髓染色体标本，制片后第三天内分色完毕，分色条件同上，观察计数方法同 4，从表上可见，分色时pH在7.5和 8 时，分色良好的细胞显著高于其他pH组，高峰值是在pH 7.5（图 5）。如果把磷酸缓冲液按pH7.5配制亦可得到部份分色良好的细胞。若把无钙镁离子的Dubecoll's缓冲液（NaCl 8.00g，KCl 0.20g，$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1.15g，KH_2PO_4 0.20g加水至1000ml）pH调至7.5时，则可得到相当数量（52%）分色良好的M_2期以上的细胞。可见 pH 是分色时的一个相当重要的因素。

讨　论

（一）BrdU的剂量和SCE频率之间的关系　我们在仓鼠体内的实验结果说明了在自发的SCE值附近，其SCE值不受BrdU剂量的影响，只有当BrdU增加到一定程度时，SCE值才显著上升。这一结果和Tice 1976年用静脉多次注射法在大鼠体内的实验结果相似，1974年Kato用D_6仓鼠细胞系亦得到相同的结论。这一现象说明在哺乳动物中，无论是体内或体外，在自发的SCE值波动范围内BrdU 的剂量有一个阈值，超过这一阈值以后SCE才明显上升。

（二）BrdU剂量和动物染色体畸变率之间的相关因素

1.我们的实验结果证明BrdU既能引起SCE率的升高又能引起染色体畸变率的增加。Hsu等1961年的报道也证明了BrdU在体外能引起染色体畸变率的增加，1974年Kato等和1976年Ticc等的报道只做了SCE，未观察染色体畸变等指标。因此我们首次在仓鼠体内系统的研究了BrdU剂量效应对SCE率和染色体畸变率的影响。

2.我们研究了BrdU的6个剂量组合，在21只仓鼠2100个中期分裂相中未看到单体互换型畸变。而Hsu 1961年的报道看到了较多的单体互换型畸变。1982年Lin等用CHW_{1102}仓鼠细胞系亦看到了单体互换型畸变。我们分析其差别的原因可能是体外无解毒系统，因而更易引起DNA的损伤的缘故。

3.我们的实验结果，证明了裂隙（gap）是药物诱导染色体畸变的一项不可忽略的指标，如0.225mg/g组中等染色单体型裂隙为1，单体型为5，而3.60mg/g组中等染色单体型升到34，单体型升到27，可见随着药物剂量的增加，染色体裂隙显著升高。以往国内的一些报道往往忽略了这一指标。而国外近年来作药物诱导实验时都把它列为一项指标，且往往和断裂一并计算，因为在光镜下它们之间很难截然分开，我们不可能对每一个裂隙去测量，以致造成人为误差。Brogger（1982）报道，他用不同的方法处理具有裂隙的染色体，证明有相当一部份DNA已断开，他认为裂隙发展趋势可能导致染色体断裂，也可能恢复，但他仍认为裂隙是低剂量诱变剂的一种敏感的指示器。Kato（1977）报道，他认为一个裂隙（gap）至少牵涉到1000个碱基对发生变化。因此我们也认为裂隙应作为测定各种诱变剂时计算染色体畸变的一项指标。

（三）姐妹染色单体分色好坏涉及到多方面的因素。我们在本实验中研究了BrdU剂量和分色时缓冲液pH对分色的影响。BrdU剂量越大分色越容易，Kanda（1979）也认为必须有足够的BrdU掺入DNA才能制得分色良好的标本。Kato（1978）认为pH 8是分色的最佳pH，根据我们的实验pH等于8时虽然分色好的细胞和pH 7.5时差不多，但染色体肿胀比较厉害，且染色时间不易掌握，因而我们认为pH7.5是分色时缓冲液的最佳pH。

（四）Karda等（1979）首先报道利用活性炭吸附BrdU注入动物体内缓慢释放的方法，但他们只做了小鼠腹水癌细胞和生殖细胞，骨髓和脾脏等未做成功。张忠恕等（1982）报道以小鼠作实验材料用活性炭方法做了小鼠生殖细胞。在我们的实验中采用一次注入法，不但获得了骨髓染色体良好的分色标本，而且也获得了脾脏淋巴细胞良好的染色体分色标本（图6）。

在我们的实验中BrdU最低剂量为0.225mg/g（体重）即相当于5mg/只的剂量，就能得到一定数量的良好的染色体分色标本。目前做体内SCE的其他方法，一种是皮下埋植片剂，这种方法一般每只小鼠要30—50mg，显然比活性炭要耗费较多的化学药品，且不方便。另一种是静脉注入法，程序太繁杂。因此我们认为用活性炭吸附BrdU方法简单易行，是进行体内SCE研究的较好方法。

小 结

本文应用BrdU活性炭悬浮液一次性注入仓鼠腹腔的方法，系统的研究了不同剂量的BrdU对仓鼠骨髓细胞染色体的SCE频率、染色体畸变率、细胞增殖周期、分裂指数以及SCD的影响。结果表明，随着BrdU剂量的增加，仓鼠骨髓淋巴细胞SCE频率和染色体畸变率明显升高。同时延缓了细胞增殖周期，抑制了细胞分裂。SCD也受BrdU剂量的影响，剂量越高分色良好细胞越多。我们还研究了分色时缓冲液pH对SCD的影响，结果显示，pH7.5为分色最佳条件。

参 考 文 献

贺维顺等 1980 一种简易的姐妹染色单体分化方法——紫外线照射加Giemsa染色（UPG）。自然杂志 8：638。

贺维顺等 1982 七种农药诱发赤麂（*Muntiacus muntjak*）离体细胞染色体畸变、姐妹染色单体交换和细胞周期的动力学变化效应。动物学研究 3（2）：129—136。

张忠恕 1982 观察体内SCE新方法 生殖与避孕 2，52—53。

Brogger A 1982 The chromatid gap a useful parameter in genotoxicology? *Cytogenet Cell Genet* 33: 14—19.

Goto K. *et al* 1978 Factors involved in differrential Giemsastaining of sister chromatids. *Chromosoma* 66: 351—359.

Hsu TC *et al* 1961 Effect of bromodeoxyuridine on mammalia Chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 396—403.

Kato H 1974 Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BudR-labelling method. *Nature* 251: 70—72.

Kato H 1977 Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 59: 179—191.

Kanda H. *et al* 1979 A simple technique for in vivo observation of sister chromatid exchange in mouse ascites tumor and spermatogonial cells. *Exp. Cell Res.* 118: 431—434.

Latt SA *et al* 1981 Sister chromatid exchange:A report of the genetox program. *Mut. Res.* 87: 17—62.

Lin MS *et al* 1982 Evidence that sister chromatid exchange and chromatid breaks are two independent events. *Chromosoma* 85: 413—419.

Paltti P. *et al* 1983 Camparison of the frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone marrow, spleen and spermatogonial cell of mice. *Mut. Res.* 103: 191—195.

Speit G 1983 Intercalating substances do not induce sister chromatid exchanges (SCEs) *in vivo*. *Mut. Res.* 104: 261—266.

Tice R. *et al* 1976 Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell Rse.* 102: 426—429.

THE CYTOGENETICAL EFFECTS OF DIFFERENT DOSAGE OF BrdU INJECTED INTO CHINESE HAMSTERS *IN VIVO*

The application of the modified mothod of "SCD by a single intraperitoneal injection of activated charcoal-absorbed BrdU"

Shan Xiangnian Sheng Xiaoyang Yan Ming Wang Shijun

(Department of Biology, Nanjing Railway Medical College)

The effects of different dosages of 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) on the frequency of SCE, chromosomal aberration rate, cell cycle, sister chromatid differentiation (SCD) of the bone marrow cells of Chinese hamsters (*Cricetulus baradensis*) *in vivo* were studied by means of a single intraperitoneal injection of activated charcoal-suspended BrdU into hamsters with an average weight of about 23g. The results indicated that there were no significant difference among SCEs induced by the dosages of 0.225mg, 0.450mg, 0.675mg/g (body weight) and thereby 3 per cell for the "spontaneous" frequency of SCE should be concluded. The frequency of SCE markedly increased at the dosage of above 0.90mg/g, while at the dosage of 3.60mg/g, the frequency of SCE induced was nearly 2.80 times as high as that of 0.225 mg/g. In accordence with our results, a new concept was suggested that there must have been a threshold of BrdU dosage in an approximation of the frequency of "spontaneous" SCE in mammals, and that of the SCE would significantly increase if the dosages of BrdU was larger than the threshold.

The effects of different dosages of BrdU on chromosomal aberration rate, cell cycle, and mitotic index of the bone marrow cells were also observed. The clear increase of gaps and breakages in chromatids and isochromatids, the delay of cell cycle, and the decrease of mitotic index were related to the dosage BrdU. These results proved that BrdU is a weak mutagen in itself.

The analysis of the effects of different dosage of BrdU on SCD suggested that the quality of differentation was positively related to the dosage of BrdU. In addition the comparison of the effects of several pH values of 2×SSC solution on SCD indicated that pH 7.5 is the most optimal.

单祥年等：仓鼠体内注射不同剂量BrdU的细胞遗传学效应——应用活性炭吸附BrdU一次注射SCD法

Shan Xiangnian et al.: The Cytogenetical Effects of Different Dosage of BrdU Injected into Chinese Hamsters *in Vivo*

The Application of the modified Mothod of "SCD by a Single Intratoneal Injection of Activated Charcoal—absorbed BrdU"

1

4

6

图 1　示仓鼠骨髓淋巴细胞自发SCE
BrdU剂量为0.675mg/g（体重）

图 4　示BrdU1.8mg/g（体重）时仓鼠骨髓淋巴细胞SCE频率

图 6　仓鼠脾脏淋巴细胞的SCE
BrdU为0.675mg/g（体重）

吕占军等：与豚鼠红细胞形成自然花环的狗淋巴细胞类别的探讨

Lü Zhanjun et al.: Identification of Categories of Canine Lymphocytes Forming Spontaneous Rosettes with Guinea Pig Erythrocytes

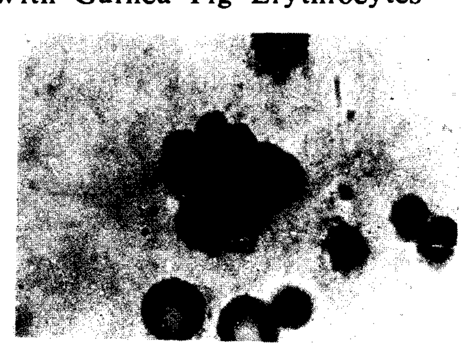


图 1　形成E—EAC混合花环的狗淋巴细胞